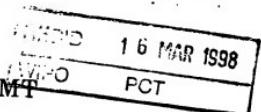


AT 98 / 00043



ÖSTERREICHISCHES PATENTAMT
WIEN I., KOHLMARKT 8-10



Geschäftszahl A 338/97

PRIORITY DOCUMENT

Vom Österreichischen Patentamt wird hiermit bestätigt, daß

die Firma IMMUNO Aktiengesellschaft
in 1221 Wien, Industriestraße 67,

am 27. Feber 1997 um 12 Uhr 37 Minuten eine

Patentanmeldung, betreffend

"Verfahren zur Reinigung von Faktor VIII/vWF-Komplex
mittels Kationenaustauscherchromatographie",

überreicht hat und daß die beigeheftete Beschreibung samt Zeichnungen
mit der ursprünglichen, zugleich mit dieser Patentanmeldung überreichten Beschreibung samt
Zeichnungen vollkommen übereinstimmt.

Österreichisches Patentamt

Wien, am 15. Jänner 1998

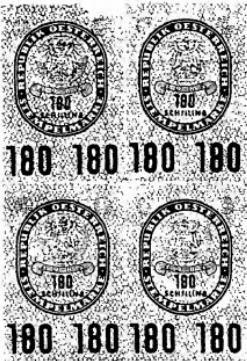
Der Präsident:

i.A.



Kanzleirat FÜHLINGER
Fachoberinspektor





ÖSTERREICHISCHES PATENTAMT
Verwaltungsstellen-Direktion

460,- S Kanzleigebühr
bezahlt Bal.

AT PATENTSCHRIFT

- (22) Patentinhaber: IMMUNO AKTIENGESELLSCHAFT
Wien (AT)
- (24) Gegenstand: Verfahren zur Reinigung von Faktor VIII/vWF-Komplex mittels Kationenaustauscherchromatographie

(61) Zusatz zu Patent Nr.

(67) Umwandlung aus GM

(62) Ausscheidung aus:

(22) (21) Angemeldet am: 27. Feb. 1997

(33) (32) (31) Unionspriorität:

- (42) Beginn der Patentdauer:
Längste mögliche Dauer:
(45) Ausgegeben am:

(72) Erfinder:

(60) Abhängigkeit:

(56) Entgegenhaltungen, die für die Beurteilung der Patentierbarkeit in Betracht gezogen wurden:

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Reinigung von Faktor VIII/vWF-Komplex aus einem biologischen Ausgangsmaterial mittels Kationenaustauscherchromatographie und stufenweiser Elution, sowie gereinigten Faktor VIII/vWF-Komplex, der insbesondere hochmolekularen vWF-Multimeren, enthält.

Im Plasma zirkuliert der von Willebrand-Faktor in einer Konzentration von 5 bis 10 mg/l und zum größten Teil in Form eines nicht-kovalent gebundenen Komplexes mit Faktor VIII. Im Kryopräzipitat ist Faktor VIII/vWF-Komplex stark angereichert und kann daraus oder aus Plasma oder Plasmafraktionen mit bekannten Fraktionierungsverfahren isoliert werden.

Bei der Hämophilie ist die Blutgerinnung durch Mangel an bestimmten plasmatischen Blutgerinnungsfaktoren gestört. Bei der Hämophilie A beruht die Blutungsneigung auf einem Mangel an Faktor VIII bzw. vWF (phänotypische Hämophilie). Die Behandlung der Hämophilie A erfolgt in erster Linie durch Ersatz des fehlenden Gerinnungsfaktors durch Faktorenkonzentrate z.B. durch Infusion von Faktor VIII oder Faktor VIII/vWF-Komplex.

Für den Einsatz zur Therapie von Patienten mit Hämophilie A, aber auch von von Willebrand-Syndrom ist ein gereinigter Faktor VIII, komplexiert mit vWF, wünschenswert (Berntorp, 1994, Haemostasis 24:289-297). Insbesondere wird immer wieder betont, daß in Präparaten ohne oder nur einem geringen Gehalt an vWF, eine verlängerte Blutungszeit und eine geringe Faktor VIII:C-Halbwertszeit in vivo zu beobachten ist. Eine Normalisierung von vWF in vivo ist wichtig, um eine Konzentration von Faktor VIII im Plasma sowohl durch Reduktion der Faktor VIII-Eliminierungsrate als auch durch Unterstützung der Freisetzung von endogenem Faktor VIII, aufrecht zu erhalten (Lethagen et al., 1992, Ann. Hematol. 65: 253-259).

Die DE 3 504 385 beschreibt die Durchführung einer Ionenaustauscherchromatographie zur Reinigung von Faktor VIII/vWF-Komplex, wobei der Faktor VIII-Komplex über Sulfatgruppen gebunden und mit Citratpuffer, Calciumchlorid und NaCl-Gradient eluiert wird.

Der Faktor VIII/vWF-Komplex wird dabei mit einer Konzentration von 0,5 M NaCl vom Träger eluiert.

Die EP 0 416 983 beschreibt die Gewinnung des Faktor VIII/vWF-Komplexes aus menschlichem Plasma durch eine Kombination aus Bariumchlorid- oder Aluminiumhydroxid-Fällung und Anionen-Austauscherchromatographie an DEAE-Fractogel.

Harrison et al. (Thrombosis Res., 1988; 50, 295-304) beschreibt die Reinigung von Faktor VIII/vWF-Komplex durch Chromatographie an Dextran-Sulfat-Sepharose.

Die EP 0 600 480 beschreibt ein Aufreinigungsverfahren für Faktor VIII/vWF-Komplex aus Vollplasma mittels kombinierter Anionenaustauscher/Kationenaustauscher-Chromatographie. Die Elution des an den Kationenaustauscher adsorbierten FVIII/vWF-Komplexes erfolgt dabei unter Verwendung eines Ca-haltigen Puffers mit 0,3 M NaCl in einem pH-Bereich zwischen 6,6 bis 7,0.

Die WO 96/10584 beschreibt ein Verfahren zur Gewinnung von hochreinem rekombinantem vWF mittels kombinierter Anionenaustauscher/Heparin-Affinitätschromatographie und die EP 0 705 846 die Trennung zwischen hoch- und niedermolekularen Fraktionen von rekombinantem vWF mittels Heparin-Affinitätschromatographie.

Die im Stand der Technik beschriebenen Faktor VIII-Präparate enthalten zwar zum größten Teil das gesamte vWF-Multimerpatttern, jedoch variieren sie im Anteil an hochmolekularen vWF (HMW-vWF) und niedermolekularen vWF (LMW-vWF) und weisen auch sogenannte Triplet-Strukturen auf, die auf einen proteolytischen Abbau, insbesondere von HMW-vWF, hinweisen. Die Stabilität dieser Präparate ist dadurch oft begrenzt.

Es wird immer wieder betont, daß Faktor VIII/vWF-Präparationen, enthaltend im wesentlichen HMW-vWF, möglicherweise einen guten Einfluß auf die Blutungszeit hätten, da sie die primäre Funktion des vWF, die Plättchenagglutination, ausführen und eine höhere Affinität zu den Plättchenrezeptoren Glykoprotein IB und IIb/IIIa haben als niedermolekulare vWF-Multimere.

Es besteht ein Bedarf an einem Faktor VIII-Komplex mit einer ausreichenden spezifischen Aktivität an Faktor VIII:C- und vWF-Aktivität. Ein Problem bei der Gewinnung eines solchen Komplexes ist insbesondere die Abtrennung von Molekülen enthaltend niedermolekulare vWF-Multimere und Anreicherung von Komplexen mit hoher spezifischer vWF-Aktivität.

Ziel der vorliegenden Erfindung ist es daher, einen Faktor VIII/vWF-Komplex mit einer verbesserten spezifischen Aktivität und Stabilität zur Verfügung zu stellen.

Ein weiteres Ziel ist es, ein Verfahren zur Gewinnung eines solchen Faktor VIII/vWF-Komplex zur Verfügung zu stellen. Das Verfahren sollte sowohl für die Reinigung von rekombinantem als auch plasmatischem Faktor VIII/vWF-Komplex einsetzbar sein.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß ein Verfahren zur Gewinnung von Faktor VIII/vWF-Komplex zur Verfügung gestellt wird, bei dem Faktor VIII/vWF-Komplex aus einer Proteinslösung an einen Kationenaustauscher gebunden wird und durch stufenweise, fraktionierte Elution Faktor VIII/vWF-Komplex mit verbesserter spezifischer vWF-Aktivität gewonnen wird. Die Gewinnung und Anreicherung von Faktor VIII/vWF mit verbesserter Aktivität und Stabilität erfolgt insbesondere dadurch, daß Faktor VIII/vWF-Komplex bei einer niedrigen Salzkonzentration gebunden wird, durch stufenweise Erhöhung der Salzkonzentration Fraktionen enthaltend Faktor VIII/vWF-Komplex mit niedermolekularen vWF-Multimeren, inaktiven vWF-Abbauprodukten und unspezifische Begleitproteine bei einer mittleren Salzkonzentration abgetrennt und Fraktionen enthaltend Faktor VIII/vWF-Komplex, der insbesondere hochmolekulare vWF-Multimere enthält, bei einer höheren Salzkonzentration gewonnen werden.

Faktor VIII/vWF-Komplex wird üblicherweise aufgrund seines sauren isoelektrischen Punktes (IEP = 5,5 bis 6) und seiner daraus resultierenden negativen Netto-Ladung im schwach sauren bis basischen Milieu über positiv geladene Anionenaustauscher aufgereinigt. Es war daher aufgrund der bisher beschriebenen Verfahren zur Reinigung von Faktor VIII/vWF-Komplex mittels positiv

geladener Anionenaustauscher nicht zu erwarten, daß Faktor VIII/vWF-Komplex ebenfalls bei einem pH-Wert, der oberhalb des IEP des Komplexes liegt, und niedriger Salzkonzentration an eine negativ geladene Gelmatrix eines Kationenaustauschers bindet und von dieser durch Erhöhung der Salzkonzentration selektiv eluierbar ist. Es war ebenfalls nicht zu erwarten, daß durch stufenweise Elution bei einer Salzkonzentration von ungefähr zwischen ≥ 250 mM und ≤ 300 mM unspezifische Begleitproteine, inaktive vWF-Abbauprodukte, Komplexkomponenten mit geringer spezifischer Aktivität, Faktor VIII/vWF-Komplex enthaltend niedermolekulare vWF-Multimere, nicht-komplexierter oder nur schwach gebundener Faktor VIII und freier Faktor VIII eluiert werden und bei einer Salzkonzentration von ≥ 300 mM insbesondere Faktor VIII/vWF-Komplex mit hochmolekularen vWF-Multimere erhalten werden.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurde festgestellt, daß mit dem erfindungsgemäßen Verfahren, ausgehend von einem unreinen biologischen Material, gereinigte Fraktionen erhalten werden, die im wesentlichen frei von kontaminierenden Nukleinsäuren sind. Dadurch werden durch das Verfahren auch Nukleinsäuren aus Proteinpräparationen entfernt. Dieser Effekt kann mit herkömmlichen Verfahren mittels Anionenaustauscher nicht gezeigt werden, da Nukleinsäuren aufgrund ihrer negativen Ladung an den Anionenaustauscher binden, sich durch Erhöhung der Salzkonzentration wieder vom Anionenaustauscher ablösen und ins Eluat gelangen.

Bei der Reinigung des Faktor VIII/vWF-Komplexes ist insbesondere zu beachten, daß, bedingt durch die Größe des vWF von 500 000 bis mehrere Millionen, nur solche Trägermaterialien gute Reinigungen und Ausbeuten liefern, die den Faktor VIII/vWF-Komplex in der Diffusion und Verteilung in den verwendeten Trägermaterialien nicht behindern. Bei der Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahren zur Reinigung von Faktor VIII/vWF-Komplex mit hoher spezifischer Aktivität mittels Kationenaustauscher wird nicht nur eine Gelmatrix verwendet, die eine hohe Beladungskapazität besitzt, robust in der Handhabung ist und ein scharfes Elutionsprofil zeigt, sondern die sich auch im industriellen Maßstab ökonomisch einsetzen läßt. Damit wird das erfindungsgemäße Verfahren insbesondere für die Gewinnung von gereinigtem Faktor

VIII/vWF-Komplex im großtechnischen Ansatz interessant.

Zur Durchführung des Verfahrens kann jeder bekannte Kationenaustauscher eingesetzt werden, wobei Kationenaustauscher mit einem Sulfopropyl- oder Carboxymethyl-Gruppen konjugierten Träger bevorzugt sind. Als gut geeignet haben sich zum Beispiel SP-Sepharose® Fast Flow und CM-Sepharose® Fast Flow (Pharmacia), Fractogel® EMD-SO3 und Fractogel® EMD COOH (Merck), Poros® 10 SP und Poros® 10 S (Perseptive Biosystems) und Toyopearl™ SP 550 C und Toyopearl™ CM-650 (M) (TosoHaas) erwiesen.

Als besonders günstig für die Gewinnung von gereinigtem vWF hat sich ein großporiges Gel mit Tentakelstruktur vom Typ Fractogel® EMD-SO3 und Fractogel® EMD COOH (Merck) erwiesen.

Die Adsorption des Faktor VIII/vWF-Komplexes an den Kationenaustauscher erfolgt vorzugsweise bei einer Salzkonzentration im Puffer von ≤ 250 mM. Durch stufenweise Erhöhung der Salzkonzentration im Puffer kann selektiv Faktor VIII/vWF-Komplex enthaltend insbesondere hochmolekulare vWF-Multimere bei einer Salzkonzentration von ≥ 300 mM, vorzugsweise ≥ 350 mM eluiert werden. Faktor VIII/vWF-Komplex enthaltend niedermolekulare vWF-Multimere und proteolytische vWF-Abbauprodukte, die in der Proteinlösung enthalten sind und die eine geringe spezifische Aktivität in bezug auf die vWF-Aktivität, insbesondere auf die Ristocetin-Kofaktor-Aktivität, die Kollagenbindungsaktivität und die spezifische Plättchenagglutinationsaktivität aufweisen, sowie freier Faktor VIII:C werden bei einer Salzkonzentration zwischen ≥ 250 mM und ≤ 300 mM, vorzugsweise bei 300 mM vom Kationenaustauscher eluiert und gegebenenfalls gewonnen. Diese Fraktion kann zur weiteren Reinigung beispielsweise von Faktor VIII:C, der insbesondere frei ist von plättchenagglutinierender vWF-Aktivität, eingesetzt werden.

Die Adsorption und Desorption des Faktor VIII/vWF kann in einem Puffer, enthaltend als Salz ein ein- oder zweiwertiges Metallion, erfolgen, wobei als Salz vorzugsweise NaCl verwendet wird.

Im erfindungsgemäßen Verfahren wird als Puffersystem zur Elution

der an den Kationenaustauscher gebundenen Proteine eine Pufferlösung bestehend aus Puffersubstanzen, insbesondere Glycin, Phosphatpuffer oder Citratpuffer, und Salz verwendet.

Der Elutionspuffer kann einen pH-Wert im Bereich zwischen 4,5 bis 8,5, vorzugsweise zwischen ≥ 7,0 und ≤ 8,5 aufweisen.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann als Batch-Verfahren oder als Säulenchromatographie durchgeführt werden.

Die optimalen Parameter wie Salzkonzentration, pH-Wert und Temperatur zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens sind jedoch jeweils abhängig vom verwendeten Kationenaustauschermaterial. Es liegt jedoch im allgemeinen Wissen eines Fachmannes, die im Rahmen der vorliegenden Erfindung offenbarten Bedingungen zur Durchführung des Verfahrens, für den jeweilig eingesetzten Kationenaustauschertyp zu optimieren.

Durch das erfindungsgemäße Verfahren wird insbesondere ein Faktor VIII/vWF-Komplex gewonnen und angereichert, der insbesondere hochmolekulare vWF-Multimere enthält.

Die gewonnene Faktor VIII/vWF-Komplex-Fraktion ist im wesentlichen frei von niedermolekularen vWF-Multimeren, vWF-Fragmenten mit geringer spezifischer Aktivität und kontaminierenden Nukleinsäuren.

Als Ausgangsmaterial zur Gewinnung von gereinigtem Faktor VIII/vWF-Komplex mit dem erfindungsgemäßen Verfahren kann jede Faktor VIII-Komplex-haltige Lösung eingesetzt werden. Ausgangsmaterialien sind insbesondere biologische Materialien, wie Plasma, eine Plasmafraktion, Kryopräzipitat, oder ein Überstand oder ein Extrakt einer rekombinanten Zellkultur.

Faktor VIII/vWF-Komplex-haltige Lösungen können jedoch auch angereicherte Proteinlösungen sein, die durch einen vorangegangenen Schritt etwa über Gelfiltration, Anionenaustauscherchromatographie, Affinitätschromatographie oder einer Kombination davon, vorgereinigt oder angereichert sind.

Gemäß einer besonderen Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird als Ausgangslösung eine über einen Anionenaustauscher angereicherte Faktor VIII/vWF-Komplex-haltige Fraktion eingesetzt. Bei der anschließenden Kationenaustauscherchromatographie erfolgt dann eine Reinigung und Trennung von Faktor VIII/vWF-Komplex enthaltend hochmolekulare bzw. niedermolekulare vWF-Multimere. Es sind jedoch auch andere Kombinationen, wie etwa Affinitäts-/Kationenaustauscher-Chromatographie, Anionenaustauscher-/Affinitäts-/Kationenaustauscherchromatographie möglich, um eine Anreicherung und selektive Gewinnung von Faktor VIII/vWF mit verbesserter spezifischer Aktivität und Stabilität zu erreichen.

Mit dem oben beschriebenen erfindungsgemäßen Verfahren wird Faktor VIII/vWF mit verbesserter spezifischer Aktivität aus einem unreinen Faktor VIII/vWF-haltigen Material vielfach angereichert.

Da prinzipiell jedes biologische Material mit infektiösen Keimen kontaminiert sein kann, wird zur Herstellung eines virussicheren Präparates die gewonnene Faktor VIII/vWF-haltige Fraktion zur Inaktivierung bzw. Abreicherung von Viren behandelt. Dazu können alle aus dem Stand der Technik bekannten Verfahren, wie chemisch/physikalische Methoden, Inaktivierung durch Kombination einer photoaktiven Substanz und Licht oder Abreicherung durch Filtration eingesetzt werden. Zur Inaktivierung von Viren eignet sich insbesondere eine Hitzebehandlung in Lösung bzw. in festem Zustand, welche sowohl lipidumhüllte als auch nicht-lipidumhüllte Viren verlässlich inaktivieren kann. Die Virusabreicherung erfolgt vorzugsweise durch eine Filtration über Nanofilter.

Gemäß einem weiteren Aspekt stellt die vorliegende Erfindung gereinigten Faktor VIII/vWF-Komplex, der insbesondere hochmolekulare vWF-Multimere enthält, erhältlich aus einer Faktor VIII/vWF-haltigen Lösung durch Kationenaustauscherchromatographie zur Verfügung. Faktor VIII/vWF mit erhöhter spezifischer vWF-Aktivität von vorzugsweise mindestens 66 U/mg Protein und erhöhter spezifischer Faktor VIII-Aktivität von vorzugsweise mindestens 500 U/mg Protein wird ausgehend von einem Ausgangsmaterial ent-

haltend u.a. Faktor VIII/vWF mit geringer Reinheit und niedriger spezifischer Aktivität angereichert und Begleitproteine, insbesondere nicht oder schwach gebundener und damit freier Faktor VIII bzw. Faktor VIII-Komplex mit geringer vWF-Aktivität, werden selektiv abgetrennt. Dadurch wird ein Faktor VIII/vWF-Komplex gewonnen, der hochmolekulare vWF-Multimere enthält und im wesentlichen frei ist von Faktor VIII-Komplex mit niedermolekularen vWF-Multimeren, vWF-Abbauprodukten, nicht-komplexiertem Faktor VIII und möglicherweise Faktor VIIIa. Der erfindungsgemäße Faktor VIII/vWF-Komplex weist aufgrund der selektiven Anreicherung von hochmolekularen vWF-Multimeren eine verbesserte Plättchenagglutinationsaktivität und eine erhöhte Stabilität auf.

Gemäß einem weiteren Aspekt wird ein Faktor VIII:C im wesentlichen frei von plättchenagglutinierender vWF-Aktivität, erhältlich aus einer Faktor VIII/vWF-haltigen Lösung, durch Kationenaustauschchromatographie und stufenweise Elution bei einer Salzkonzentration zwischen ≥ 200 mM und ≤ 300 mM zur Verfügung gestellt.

Gemäß einem weiteren Aspekt wird eine gereinigte Präparation enthaltend Faktor VIII/vWF-Komplex, der insbesondere hochmolekulare vWF-Multimere enthält, oder Faktor VIII:C, im wesentlichen frei von plättchenagglutinierender vWF-Aktivität, zur Verfügung gestellt

Bei Gewinnung und Herstellung der erfindungsgemäßen Präparation mit einem Ausgangsmaterial plasmatischen oder rekombinannten Ursprungs wird, wie oben beschrieben, zur Entfernung von infektiösen Partikeln gegebenenfalls ein Virusabreicherungs/oder Inaktivierungsverfahren durchgeführt, wobei eine Virusinaktivierung und/oder Virusabreicherung prinzipiell vor oder nach jedem Reinigungsschritt ausgehend vom Ausgangsmaterial bis zur hergestellten pharmazeutischen Zubereitung erfolgen kann. Damit ist die erfindungsgemäße Präparation in jedem Fall virussicher und frei von infektiösem Material.

Ein weiteres Kriterium für die Reinheit und geringe Infektiosität eines Produktes ist auch die Abwesenheit von kontaminieren-

den Nukleinsäuren. Die erfindungsgemäße Präparation ist daher im wesentlichen frei von Nukleinsäuren. "Im wesentlichen" bedeutet hier, daß der Gehalt an Nukleinsäure $\leq 0,7$ bezogen auf das Verhältnis 260/280 nm ist. Die Nukleinsäure kann jedoch auch gemäß einem Verfahren, wie es beispielsweise in der EP 0 714 987 und der EP 0 714 988 beschrieben wird, quantifiziert werden.

Gemäß einem weiteren Aspekt liegt die erfindungsgemäße Präparation in einer lagerstabilen Form vor. Die Präparation enthaltend gereinigten Faktor VIII/vWF mit verbesserter spezifischer vWF-Aktivität kann als fertige Lösung, Lyophilisat oder tiefgefroren bereitgestellt werden. Aufgrund ihrer Reinheit ist die Präparation besonders stabil. Es hat sich gezeigt, daß die erfindungsgemäße Präparation bei -20°C für mindestens 6 Monate, bei 4°C in Lösung für mindestens 4 Wochen und als Lyophilisat für mindestens 1 Jahr stabil ist. Es zeigte sich, daß innerhalb des jeweiligen Zeitraumes die Faktor VIII/vWF-Aktivität um maximal 10% reduziert wird und das Multimermuster der vWF-Multimere keine wesentliche Änderung zeigt.

Die Formulierung der erfindungsgemäßen Präparation kann in an sich bekannter und üblicher Weise erfolgen. Der gereinigte Faktor VIII/vWF, enthalten in der erfindungsgemäßen Präparation, wird mit einem Puffer enthaltend Salze, wie NaCl, Trinatriumcitratdihydrat und/oder CaCl₂, und Aminosäuren, wie Glycin und Lysin, bei einem pH im Bereich von 6 bis 8 gemischt und als pharmazeutisches Präparat formuliert.

Die Präparation kann zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Patienten mit Hämophilie, phänotypischer Hämophilie und vWD verwendet werden.

Die Erfindung wird anhand der nachfolgenden Beispiele und der Zeichnungsfiguren näher erläutert, wobei sie jedoch nicht auf diese Ausführungsbeispiele beschränkt ist.

Es zeigen:

Figur 1: vWF-Multimer-Analyse von Faktor VIII/vWF-Komplex aus

Kryopräzipitat vor und nach Reinigung mit Kationen-austauscher

Figur 2: vWF-Multimer-Analyse von Faktor VIII/vWF-Komplex aus Kryopräzipitat vor und nach Reinigung mittels kombinierter Anionen/Kationenaustauscherchromatographie

Beispiel 1 beschreibt die Reinigung von plasmatischem Faktor VIII/vWF-Komplex durch Kationenaustauscherchromatographie und stufenweiser Elution; Beispiel 2 beschreibt die Reinigung von Faktor VIII/vWF-Komplex durch Kombination von Anionen-/Kationen-austauscherchromatographie und stufenweiser Elution vom Kationenaustauscher; Beispiel 3 beschreibt die Reinigung von rvWF/rFaktor VIII-Komplex mittels Kationenaustauscher.

B e i s p i e l 1:

Reinigung von plasmatischem FVIII-Komplex durch Kationen-Austauscherchromatographie

Kryopräzipitat aus humanem Plasma wurde in Natrium-Acetat-Puffer, pH 7, aufgelöst und es wurden 20 Einheiten Heparin pro ml Lösung zugegeben. Pro 1 g Kryopräzipitat wurden 0,25 ml 2% Al(OH)₃-Suspension zugegeben, und für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurde für 20 Minuten bei 10000 RPM zentrifugiert, um ein trübungsfreies Kryopräzipitat zu erhalten.

Eine Chromatographiesäule wurde mit Fractogel® EMD-SO3 gefüllt und mit Puffer (30 mM Glycin-NaCl-Puffer) gespült. Anschließend wurde aufgelöstes Kryopräzipitat durch die Kationenaustauschersäule filtriert und im Durchfluß wurden solche Proteine erhalten, die nicht an den Austauscher binden (Fraktion 1). Unspezifisch gebundene Proteine wurden durch Spülen der Säule mit 0,3 M NaCl in Puffer entfernt (Fraktion 2). Anschließend wurde FVIII/vWF-Komplex von der Austauschersäule durch Elution mit 0,4 M bzw. 0,5 M NaCl eluiert (Fraktion 3 bzw. Fraktion 4).

Aus der Tabelle 1 ist ersichtlich, daß sowohl vWF als auch FVIII durch den Kationenaustauscher gebunden wurden. Durch Spülen der Kationenaustauschersäule mit 0,3 M NaCl (Fraktion 2) wurden kein vWF und nur 10 % der FVIII-Aktivität erhalten. Durch diese Elu-

tionsstufe wurde der FVIII, der nicht als Komplex mit funktionell aktivem vWF vorlag, abgetrennt. Durch anschließende Desorption mit 0,4 M NaCl (Fraktion 3) wurde FVIII/vWF-Komplex erhalten, der etwa 20 % des funktionell aktiven vWF und etwa 30 % der Gesamtmenge an FVIII enthielt. Der restliche FVIII-Komplex wurde anschließend mit 500 mM NaCl vom Kationenaustauscher eluiert (Fraktion 4). Fraktion 4 enthielt Faktor VIII/vWF-Komplex, der 80 % der vWF-Aktivität und 50 % der FVIII-Aktivität ausgehend vom Kryopräzipitat beinhaltet. Durch die Kationenaustauscher-chromatographie kam es zu einer 20-fachen Reinigung von FVIII (spezifische Aktivität: 12 IU FVIII:C/mg Protein) gegenüber Kryopräzipitat bzw. zu einer 350-fachen Aufreinigung von FVIII bezogen auf Plasma (Fraktion 4). Aus der Fraktion 3 kann FVIII gewonnen werden.

Figur 1 zeigt die vWF-Multimer-Analyse von Faktor VIII/vWF-Komplex vor und nach Reinigung mit Kationenaustauscher, wobei Spur A das vWF-Multimermuster des Kryopräzipitats, Spur B des 300 mM NaCl-Eluats (Fraktion 2, Tabelle 1), Spur C des 400 mM NaCl-Eluats (Fraktion 3, Tabelle 1) und Spur D des 500 mM Eluats (Fraktion 4, Tabelle 1) darstellt. Aus Figur 1 ist ersichtlich, daß durch die Kationenaustauscherchromatographie ein Faktor VIII/vWF-Komplex mit hochmolekularen vWF-Multimerstruktur erhalten wird. Faktor VIII/vWF-Komplex enthaltend niedermolekulare vWF-Multimere wird entweder nicht an den Kationenaustauscher gebunden (Fraktion 1) oder bei der Elution mit 0,3 M NaCl abgetrennt (Fraktion 2).

Tabelle 1 Reinigung von FVIII/vWF-Komplex aus Kryopräzipitat mittels Kationenaustauscherchromatographie

Probe	vWF:Risto-CoF-Aktivität (U/ml)	FVIII:C-Aktivität (U/ml)
Kryopräzipitat	2,2	2,4
Faktion 1 (Nicht gebunden)	0	0
Faktion 2 (Eluat 300 mM NaCl)	0	0,1
Faktion 3 (Eluat 400 mM NaCl)	1,8	3,6
Faktion 4 (Eluat 500 mM NaCl)	1,8	1,5

B e i s p i e l 2 :

Reinigung von plasmatischem FVIII/vWF-Komplex durch Kombination von Anionen-/Kationenaustauscherchromatographie

Kryopräzipitat aus humanem Plasma wurde in einem Puffer aus 7 mM Tris, 100 mM Na-Aacetat, 100 mM Lysin, 120 mM NaCl bei pH 6,7 aufgelöst. Zur Vorbehandlung wurde Al(OH)₃ eingerührt. Anschließend wurde der Niederschlag durch Zentrifugation abgetrennt.

Auf diese Weise vorbehandeltes Kryopräzipitat wurde auf eine Säule Fractogel® EMD-TMAE aufgetragen. Nicht gebundene Proteine wurde durch Spülen der Säule mit Lösungspuffer erhalten (Fraktion 1). Diese Fraktion 1 enthielt 60 % der vWF-Aktivität, jedoch nur 10 % der FVIII-Aktivität. Durch Elution der Säule mit 400 mM NaCl (Fraktion 2) wurde anschließend FVIII/vWF-Komplex erhalten. Fraktion 2 enthielt die restliche vWF-Aktivität und 70 % der FVIII-Aktivität ausgehend vom Kryopräzipitat.

Tabelle 2 Reinigung von FVIII-vWF-Komplex durch Kombination von Anionen- und Kationenaustauscherchromatographie

Probe	vWF:RistoCoF-Aktivität (U/ml)	FVIII:C Aktivität (U/ml)
Kryopräzipitat	12,5	12,2
Fraktion 1 (nicht gebunden)	3,5	0,7
Fraktion 2 (Eluat 400 mM NaCl)	2,5	14,5

Der FVIII/vWF-Komplex der Fraktion 2 wurde mit 20 mM Glycin/
NaCl-Puffer 4-fach verdünnt, und anschließend auf eine Kationen-
austauschersäule Fractogel® EMD-SO3 aufgetragen. Nicht-bindende
Proteine wurden in der Fraktion 1 erhalten. Schwach gebundene
Proteine wurden durch Spülen der Säule mit 200 mM NaCl entfernt
(Fraktion 2). Anschließend wurde stufenweise mit 400 mM NaCl
(Fraktion 3) und 500 mM NaCl (Fraktion 4) eluiert. In den Frak-
tionen 3 und 4 wurden jeweils 45 % der vWF-Aktivität und 55 %
bzw. 40 % der FVIII-Aktivitäten gefunden.

Tabelle 3 Reinigung von FVIII/vWF-Komplex durch Kombination
von Anionen- und Kationenaustauscherchromatographie

Probe	vWF:RistoCoF Aktivität (U/ml)	FVIII:C Aktivität (U/ml)
Ausgang	0,63	3,6
Fraktion 1 (nicht gebunden)	0	0
Fraktion 2 (Eluat 200 mM NaCl)	0	0
Fraktion 3 (Eluat 400 mM NaCl)	0,3	2,26
Fraktion 4 (Eluat 500 mM NaCl)	0,25	1,43

Aus der Tabelle 3 ist ersichtlich, daß sowohl vWF als auch FVIII
durch den Kationenaustauscher gebunden werden. Durch Spülen der
Kationenaustauschersäule mit 0,2 M NaCl (Fraktion 2) wurde kein

aktiver vWF und kein FVIII gefunden. Der FVIII/vWF-Komplex wurde anschließend in den Fraktionen 3 und 4 eluiert.

Während die spezifische Aktivität des FVIII:C im Kryopräzipitat 0,59 U/mg Protein betrug, beträgt die spezifische Aktivität des FVIII:C in den Fraktionen 3 und 4 500 U/mg Protein bzw. 477 U/mg Protein. Die spezifische Aktivität des vWF stieg ausgehend von Kryopräzipitat 0,6 U/mg Protein auf 66 U/mg Protein und 83 U/mg Protein in den Fraktionen 3 und 4.

Figur 2 zeigt die vWF-Multimer-Analyse von Faktor VIII/vWF-Komplex vor und nach Reinigung mit kombinierter Anionen-/Kationenaustauscherchromatographie, wobei die Spuren a bis c die Chromatographie am Anionenaustauscher und die Spuren d bis g am Kationenaustauscher zeigen. Fig. 2 zeigt in Spur a das vWF-Multimermuster des Kryopräzipitats, Spur b des Durchlaufs (Fraktion 1, Tabelle 2), Spur c des 400 mM NaCl-Eluats (Fraktion 2, Tabelle 2), Spur d des 400 mM NaCl-Eluats (Fraktion 2, Tabelle 2) vor Kationenaustauscher, Spur e des 200 mM NaCl-Eluats (Fraktion 2, Tabelle 3), Spur f des 400 mM NaCl-Eluats (Fraktion 3, Tabelle 3) und Spur g des 500 mM NaCl-Eluats (Fraktion 4, Tabelle 3).

B e i s p i e l 3 :

Reinigung eines r-vWF/r-FVIII-Komplexes mittels Kationenaustauscherchromatographie

1000 ml eines Zellkulturüberstandes, enthaltend rekombinanen rFVIII/rvWF-Komplex, wurden auf eine Säule, gefüllt mit 20 ml Fractogel® TSK-SO3, aufgetragen. Nach dem Waschen der Säule mit Puffer, pH 7,4, mit 250 mM NaCl, wurde der gebundene rFVIII/rvWF-Komplex mit einem Puffer, pH 7,4, mit 600 mM NaCl eluiert. In Tabelle 4 sind die Ergebnisse dieses Säulenlaufes dargestellt.

Tabelle 4 Reinigung von rekombinanen rFVIII/rvWF-Komplex mittels Kationenaustauscherchromatographie

Probe	FVIII:C Aktivität (U/ml)	vWF:RistoCoF-Aktivität (U/ml)
Ausgang	2,3	0,1
Durchfluß	0,1	0
250 mM NaCl-Eluat	0,2	0
600 mM NaCl-Eluat	85	4,4

Das Beispiel zeigt, daß ein Komplex bestehend aus rekombinantem FVIII und rekombinantem vWF (der normalerweise während der Fermentation von rekombinantem FVIII anfällt) an einen Kationenaustauscher bindet und selektiv durch Erhöhung der Salzkonzentration, von Begleitproteinen getrennt, eluiert werden kann.

In dem Beispiel wurde ein rFVIII/rvWF-Komplex mit einer spezifischen FVIII-Aktivität von 130 U/mg Protein in einer Ausbeute von 75% erhalten. Dies entspricht einem Reinigungsfaktor von 28 für diesen Schritt. Die spezifische Aktivität des r-vWF hängt stark von der Qualität des exprimierten r-vWF ab. In diesem Fall lag sie bei 7 U/mg im Eluat, was einem Reinigungsfaktor von 35 entspricht.

Durch Variation des rFVIII/rvWF-Verhältnisses im Ausgang, oder durch Anschließen eines weiteren chromatographischen Schrittes, kann die spezifische Aktivität des FVIII:C noch weiter verbessert werden.

P a t e n t a n s p r ü c h e :

1. Verfahren zur Gewinnung von Faktor VIII/vWF-Komplex, dadurch gekennzeichnet, daß Faktor VIII/vWF-Komplex aus einer Proteinlösung an einen Kationenaustauscher gebunden und durch stufenweise Elution Faktor VIII/vWF-Komplex, der insbesondere hochmolekulare vWF-Multimere enthält, gewonnen wird.
2. Verfahren nach einem der Ansprüche 1, dadurch gekennzeichnet, daß Faktor VIII/vWF-Komplex bei einer Salzkonzentration von ≤ 250 mM an einen Kationenaustauscher gebunden wird und Faktor VIII/vWF-Komplex, enthaltend niedermolekulare vWF-Multimere, Faktor VIII frei von plättchenagglutinierender vWF-Aktivität und Faktor VIII:C bei einer Salzkonzentration zwischen ≥ 250 mM und ≤ 300 mM eluiert und gewonnen werden.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß Faktor VIII/vWF-Komplex, enthaltend insbesondere hochmolekulare vWF-Multimere, durch stufenweise Fraktionierung bei einer Salzkonzentration von ≥ 300 mM, vorzugsweise ≥ 350 mM gewonnen wird.
4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß eine Faktor VIII/vWF-Komplex-haltige Fraktion gewonnen wird, die insbesondere frei ist von niedermolekularen vWF-Multimeren und vWF-Abbauprodukten, nicht-komplexierten, oder schwach an vWF gebundenem Faktor VIII und kontaminierenden Nukleinsäuren.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Elution der Polypeptide vom Kationenaustauscher in einem Puffersystem mit einem pH-Wert im Bereich zwischen 4,5 und 8,5, vorzugsweise $\geq 7,1$ und $\leq 8,5$ erfolgt.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß der Kationenaustauscher ein Sulfopropyl- oder Carboxymethyl-Gruppen konjugierte Träger ist.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß ein Faktor VIII/vWF-Komplex enthaltend insbeson-

dere hochmolekulare vWF-Multimere gewonnen wird.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7 dadurch gekennzeichnet, daß Faktor VIII/vWF-Komplex aus Plasma, einer Plasmafraktion, Kryopräzipitat, dem zellfreien Überstand oder Extrakt einer rekombinanten Zellkultur, oder einer angereicherten Proteinfaktion gewonnen wird.

9. Faktor VIII/vWF-Komplex, enthaltend insbesondere hochmolekulare vWF-Multimere, erhältlich aus einer Faktor VIII/vWF-haltigen Lösung durch Kationenaustauscherchromatographie.

10. Faktor VIII/vWF-Komplex nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß er insbesondere frei ist von niedermolekularen vWF-Multimeren, inaktiven vWF-Abbauprodukten und Faktor VIII frei von plättchenagglutinierender vWF-Aktivität und von Faktor VIIIa-Aktivität.

11. Faktor VIII/vWF-Komplex nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß er eine spezifische vWF-Aktivität von mindestens 66 U/mg Protein und eine spezifische Faktor VIII-Aktivität von mindestens 500 U/mg Protein aufweist.

12. Faktor VIII:C im wesentlichen frei von plättchenagglutinierender vWF-Aktivität, erhältlich aus einer Faktor VIII/vWF-haltigen Lösung durch Kationenaustauscherchromatographie und stufenweise Elution bei einer Salzkonzentration zwischen ≥ 200 mM und ≤ 300 mM.

13. Präparation enthaltend Faktor VIII/vWF-Komplex oder Faktor VIII:C gemäß einem der Ansprüche 11 oder 12, dadurch gekennzeichnet, daß sie virussicher und frei von infektiösem Material ist.

14. Präparation nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß sie in einer lagerstabilen Form vorliegt.

15. Präparation nach einem der Ansprüche 13 oder 14, dadurch ge-

kennzeichnet, daß sie als pharmazeutisches Präparat formuliert ist.

16. Verwendung einer Präparation nach einem der Ansprüche 13 bis 15 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Patienten mit Hämophilie A, phänotypischen Hämophilie und vWD.

27. Feb. 1997

Z u s a m m e n f a s s u n g :

Beschrieben wird ein Verfahren zur Gewinnung von Faktor VIII/vWF-Komplex, welches sich dadurch auszeichnet, daß Faktor VIII/vWF-Komplex aus einer Proteinlösung an einen Kationenaustauscher gebunden und durch stufenweise Elution Faktor VIII/vWF-Komplex, der insbesondere hochmolekulare vWF-Multimere enthält, gewonnen wird, sowie ein Faktor VIII/vWF-Komplex, erhältlich mittels Kationenaustauscherchromatographie.

Fig. 1.

A 338/97-1

1/2

Urtext

A B C D



FIG. 1

A 338/97-1

Urtext

2/2

a b c d e f g



FIG. 2

AKTENEXEMPLAR

PCT

ANTRAG

Der Unterzeichnete beantragt, daß die vorliegende internationale Anmeldung nach dem Vertrag über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens behandelt wird.

Vom Anmeldeamt auszufüllen

PIAT 98/00043

Internationales Aktenzeichen

27. FEBRUAR 1998
(27.02.98)

Internationales Anmeldedatum
Osterreichisches Patentamt
PCT International Application
Name des Anmeldeamts und "PCT International Application"

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts (falls gewünscht)
(max. 12 Zeichen) R 33814

Feld Nr. I BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG
Verfahren zur Reinigung von Faktor VIII/vWF-Komplex mittels Kationenaustauscherchromatographie

Feld Nr. II ANMELDER

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

[IMMUNO Aktiengesellschaft] #23
Industriestraße 67,
A - 1221 Wien, Österreich (AT)

Diese Person ist gleichzeitig Erfinder

Telefonnr.:

Telefaxnr.:

Fernschreibrn.:

Staatsangehörigkeit (Staat): AT

Sitz oder Wohnsitz (Staat): AT

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten: alle Bestimmungsstaaten alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika nur die Vereinigten Staaten von Amerika die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Feld Nr. III WEITERE ANMELDER UND/ODER (WEITERE) ERFINDER

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

MITTERER, Artur
A - 2304 Mannsdorf 116
Österreich (AT)

Diese Person ist:

nur Anmelder

Anmelder und Erfinder

nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat): AT

Sitz oder Wohnsitz (Staat): AT

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten: alle Bestimmungsstaaten alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika nur die Vereinigten Staaten von Amerika die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Weitere Anmelder und/oder (weitere) Erfinder sind auf einem Fortsetzungsbogen angegeben.

Feld Nr. IV ANWALT ODER GEMEINSAMER VERTRÉTER; ZUSTELLANSCHRIFT

Die folgende Person wird hiermit bestellt/ist bestellt worden, um für den (die) Anmelder vor den zuständigen internationalen Behörden in folgender Eigenschaft zu handeln als: Anwalt gemeinsamer Vertreter

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)

Telefonnr.:

3-1-512 84 05

SONN Helmut, PAWLOY Heinrich, WEINZINGER Arnulf, PAWLOY Peter, ALGE Daniel Riemergasse 14, A - 1010 Wien, Österreich (AT)

Telefaxnr.:

1-512 98 05

Fernschreibrn.:

Dieses Kästchen ist anzukreuzen, wenn kein Anwalt oder gemeinsamer Vertreter bestellt ist und statt dessen im obigen Feld eine spezielle Zustellanschrift angegeben ist.



Fortsetzung von Feld Nr. III WEITERE ANMELDER UND/ODER (WEITERE) ERFINDER

Wird keines der folgenden Felder benutzt, so ist dieses Blatt dem Antrag nicht beizufügen.

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Annehmers, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

*Change
Sear
A 18
+ 21*

FISCHER, Bernhard
Jägerhausgasse 14/11,
A - 1120 Wien, Österreich (AT)

- Diese Person ist:
- nur Anmelder
- Anmelder und Erfinder
- nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat): DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat): AT

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

- alle Bestimmungsstaaten
- alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika

- nur die Vereinigten Staaten von Amerika

- die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Annehmers, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

SCHÖNBERGER, Öyvind L.
Schopenhauerstraße 52/7,
A - 1180 Wien, Österreich (AT)

- Diese Person ist:

- nur Anmelder
- Anmelder und Erfinder
- nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat): DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat): AT

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

- alle Bestimmungsstaaten
- alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika

- nur die Vereinigten Staaten von Amerika

- die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Annehmers, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

THOMAS-URBAN, Kathrin
Kartäuserstraße 149
D - 79104 Freiburg, Deutschland (DE)

- Diese Person ist:

- nur Anmelder
- Anmelder und Erfinder
- nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat): AU

Sitz oder Wohnsitz (Staat): DE

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

- alle Bestimmungsstaaten
- alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika

- nur die Vereinigten Staaten von Amerika

- die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Annehmers, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

DORNER, Friedrich
Peterlinigasse 17,
A - 1230 Wien, Österreich (AT)

- Diese Person ist:

- nur Anmelder
- Anmelder und Erfinder
- nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat): AT

Sitz oder Wohnsitz (Staat): AT

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

- alle Bestimmungsstaaten
- alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika

- nur die Vereinigten Staaten von Amerika

- die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Weitere Anmelder und/oder (weitere) Erfinder sind auf einem zusätzlichen Fortsetzungsblatt angegeben.



Fortsetzung von Feld Nr. III WEITERE ANMELDER UND/ODER (WEITERE) ERFINDER

Wird keines der folgenden Felder benutzt, so ist dieses Blatt dem Antrag nicht beizufügen.

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

EIBL, Johann
Gustav-Tschermäkgasse 2,
A - 1180 Wien, Österreich (AT)

Diese Person ist:

- nur Anmelder
 Anmelder und Erfinder
 nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat): AT

Sitz oder Wohnsitz (Staat): AT

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten: alle Bestimmungsstaaten alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika nur die Vereinigten Staaten von Amerika die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

LINNAU, Yendra
Lavendelweg 24,
A - 1224 Wien, Österreich (AT)

Diese Person ist:

- nur Anmelder
 Anmelder und Erfinder
 nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat): AT

Sitz oder Wohnsitz (Staat): AT

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten: alle Bestimmungsstaaten alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika nur die Vereinigten Staaten von Amerika die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

SCHÜNHOFER, Wolfgang
Ringelnatzgasse 5/C1,
A - 3100 St. Pölten, Österreich (AT)

Diese Person ist:

- nur Anmelder
 Anmelder und Erfinder
 nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat): AT

Sitz oder Wohnsitz (Staat): AT

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten: alle Bestimmungsstaaten alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika nur die Vereinigten Staaten von Amerika die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

Diese Person ist:

- nur Anmelder
 Anmelder und Erfinder
 nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten: alle Bestimmungsstaaten alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika nur die Vereinigten Staaten von Amerika die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Weitere Anmelder und/oder (weitere) Erfinder sind auf einem zusätzlichen Fortsetzungsblatt angegeben.



Feld Nr. V BESTIMMUNG VON STAATEN

Die folgenden Bestimmungen nach Regel 4.9 Absatz a werden hiermit vorgenommen (bitte die entsprechenden Kästchen ankreuzen; wenigstens ein Kästchen muß angekreuzt werden):

Regionales Patent

- AP ARIPO-Patent: GH Ghana, GM Gambia, KE Kenia, LS Lesotho, MW Malawi, SD Sudan, SZ Swasiland, UG Uganda, ZW Simbabwe und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Harare-Protokolls und des PCT ist
- EA Eurasisches Patent: AM Armenien, AZ Aserbaidschan, BY Belarus, KG Kirgisistan, KZ Kasachstan, MD Republik Moldau, RU Russische Föderation, TJ Tadschikistan, TM Turkmenistan und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Eurasischen Patentübereinkommens und des PCT ist
- EP Europäisches Patent: AT Österreich, BE Belgien, CH und LI Schweiz und Liechtenstein, DE Deutschland, DK Dänemark, ES Spanien, FI Finnland, FR Frankreich, GB Vereinigtes Königreich, GR Griechenland, IE Irland, IT Italien, LU Luxemburg, MC Monaco, NL Niederlande, PT Portugal, SE Schweden und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Europäischen Patentübereinkommens und des PCT ist
- OA OAPI-Patent: BF Burkina Faso, BJ Benin, CF Zentralafrikanische Republik, CG Kongo, CI Côte d'Ivoire, CM Kamerun, GA Gabun, GN Guine, ML Mali, MR Mauritanie, NE Niger, SN Senegal, TD Tschad, TG Togo und jeder weitere Staat der Vertragsstaat der OAPI und des PCT ist (falls eine andere Schutzrechtsart oder ein sonstiges Verfahren gewünscht wird, bitte auf der gepunkteten Linie angeben)

Nationales Patent (falls eine andere Schutzrechtsart oder ein sonstiges Verfahren gewünscht wird, bitte auf der gepunkteten Linie angeben):

- | | |
|---|---|
| <input type="checkbox"/> AL Albanien | <input type="checkbox"/> LT Litauen |
| <input type="checkbox"/> AM Armenien | <input type="checkbox"/> LU Luxemburg |
| <input type="checkbox"/> AT Österreich | <input type="checkbox"/> LV Lettland |
| <input checked="" type="checkbox"/> AU Australien | <input type="checkbox"/> MD Republik Moldau |
| <input type="checkbox"/> AZ Aserbaidschan | <input type="checkbox"/> MG Madagaskar |
| <input type="checkbox"/> BA Bosnien-Herzegowina | <input type="checkbox"/> MK Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien |
| <input type="checkbox"/> BB Barbados | <input type="checkbox"/> MN Mongolei |
| <input type="checkbox"/> BG Bulgarien | <input type="checkbox"/> MW Malawi |
| <input checked="" type="checkbox"/> BR Brasilien | <input checked="" type="checkbox"/> MX Mexiko |
| <input type="checkbox"/> BY Belarus | <input type="checkbox"/> NO Norwegen |
| <input checked="" type="checkbox"/> CA Kanada | <input type="checkbox"/> NZ Neuseeland |
| <input type="checkbox"/> CH und LI Schweiz und Liechtenstein | <input checked="" type="checkbox"/> PL Polen |
| <input type="checkbox"/> CN China | <input type="checkbox"/> PT Portugal |
| <input type="checkbox"/> CU Kuba | <input type="checkbox"/> RO Rumänien |
| <input checked="" type="checkbox"/> CZ Tschechische Republik | <input checked="" type="checkbox"/> RU Russische Föderation |
| <input type="checkbox"/> DE Deutschland | <input type="checkbox"/> SD Sudan |
| <input type="checkbox"/> DK Dänemark | <input type="checkbox"/> SE Schweden |
| <input type="checkbox"/> EE Estland | <input type="checkbox"/> SG Singapur |
| <input type="checkbox"/> ES Spanien | <input checked="" type="checkbox"/> SI Slowenien |
| <input type="checkbox"/> FI Finnland | <input checked="" type="checkbox"/> SK Slowakei |
| <input type="checkbox"/> GB Vereinigtes Königreich | <input type="checkbox"/> SL Sierra Leone |
| <input type="checkbox"/> GE Georgien | <input type="checkbox"/> TJ Tadschikistan |
| <input type="checkbox"/> GH Ghana | <input type="checkbox"/> TM Turkmenistan |
| <input type="checkbox"/> GM Gambia | <input type="checkbox"/> TR Türkei |
| <input type="checkbox"/> GW Guinea-Bissau | <input type="checkbox"/> TT Trinidad und Tobago |
| <input checked="" type="checkbox"/> HU Ungarn | <input type="checkbox"/> UA Ukraine |
| <input type="checkbox"/> ID Indonesien | <input type="checkbox"/> UG Uganda |
| <input checked="" type="checkbox"/> IL Israel | <input checked="" type="checkbox"/> US Vereinigte Staaten von Amerika |
| <input type="checkbox"/> IS Island | <input type="checkbox"/> UZ Usbekistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> JP Japan | <input type="checkbox"/> VN Vietnam |
| <input type="checkbox"/> KE Kenia | <input type="checkbox"/> YU Jugoslawien |
| <input type="checkbox"/> KG Kirgisistan | <input type="checkbox"/> ZW Simbabwe |
| <input type="checkbox"/> KP Demokratische Volksrepublik Korea | |
| <input type="checkbox"/> KR Republik Korea | |
| <input type="checkbox"/> KZ Kasachstan | |
| <input type="checkbox"/> LC Saint Lucia | |
| <input type="checkbox"/> LK Sri Lanka | |
| <input type="checkbox"/> LR Liberia | |
| <input type="checkbox"/> LS Lesotho | |

Kästchen für die Bestimmung von Staaten (für die Zwecke eines nationalen Patents), die dem PCT nach der Veröffentlichung dieses Formblatts beigetreten sind:

-
-
-
-

Zusätzlich zu den oben genannten Bestimmungen nimmt der Anmelder nach Regel 4.9 Absatz b auch alle anderen nach dem PCT zulässigen Bestimmungen vor mit Ausnahme der Bestimmung von _____.

Der Anmelder erklärt, daß diese zusätzlichen Bestimmungen unter dem Vorbehalt einer Bestätigung stehen und jede zusätzliche Bestimmung, die vor Ablauf von 15 Monaten ab dem Prioritätsdatum nicht bestätigt wurde, nach Ablauf dieser Frist als vom Anmelder zurückgenommen gilt. (Die Bestätigung einer Bestimmung erfolgt durch die Einreichung einer Mitteilung, in der diese Bestimmung angegeben wird, und die Zahlung der Bestimmungs- und der Bestätigungsgebühr. Die Bestätigung muß beim Anmeldeamt innerhalb der Frist von 15 Monaten eingehen.)

Feld Nr. VI PRIORITYÄTSANSPRUCH		Weitere Prioritätsansprüche sind im Zusatzfeld angegeben.	
Die Priorität der folgenden früheren Anmeldung(en) wird hiermit beansprucht:			
Staat (Anmelde- oder Bestimmungstaat der Anmeldung)	Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr)	Aktenzeichen	Anmeldeamt (nur bei regionaler oder internationaler Anmeldung)
(1) AT	27. Februar 1997 (27.02.97) AA	A 338/97	<i>AA vom RO beachtlichen</i>
(2)			
(3)			

Dieses Kästchen ankreuzen, wenn die beglaubigte Kopie der früheren Anmeldung von dem Amt ausgestellt werden soll, das für die Zwecke dieser internationalen Anmeldung Anmeldeamt ist (eine Gebühr kann verlangt werden).
 Das Anmeldeamt wird hiermit ersucht, eine beglaubigte Abschrift der oben in Zeile(n) _____ bezeichneten früheren Anmeldung(en) zu erstellen und dem Internationalen Büro zu übermitteln.

Feld Nr. VII INTERNATIONALE RECHERCHENBEHÖRDE		
Wahl der Internationalen Recherchenbehörde (ISA) (Sind zwei oder mehr Internationale Recherchenbehörden für die internationale Recherche zuständig, ist der Name der Behörde anzugeben, die die internationale Recherche durchführen soll. Zwei-buchstaben-Code genügt).		
Frühere Recherche: Aussfüllen, wenn eine Recherche (internationale Recherche, Recherche internationaler Art oder sonstige Recherche) bereits bei der internationalen Recherchenbehörde beantragt oder von ihr abgeschafft worden ist und diese Behörde nun ersucht wird, die internationale Recherche sowie/wie möglich alle die Ergebnisse einer solchen früheren Recherche zu stützen. Die Recherche oder der Recherchenantrag ist durch Angabe der betreffenden Anmeldung (bzw. deren Übersetzung) oder des Recherchenantrags zu bezeichnen.		
Staat (oder regionales Amt):	Datum (Tag/Monat/Jahr):	Aktenzeichen:

Feld Nr. VIII KONTROLLISTE		
Diese internationale Anmeldung umfaßt:		Diese internationale Anmeldung liegen die nachstehend angekreuzten Unterlagen bei:
1. Antrag : 5 Blätter	<input checked="" type="checkbox"/> Unterzeichnete gesonderte Vollmachten folgen	
2. Beschreibung : 18 Blätter	<input type="checkbox"/> Kopie der allgemeinen Vollmacht	
3. Ansprüche : 3 Blätter	<input type="checkbox"/> Begründung für das Fehlen der Unterschrift	
4. Zusammenfassung : 1 Blätter	<input type="checkbox"/> Prioritätsbeleg(e) (durch Nr. VI kennzeichnen):	
5. Zeichnungen : 2 Blätter	<input type="checkbox"/> 5. Blatt für die Gebührenberechnung	
Insgesamt : 29 Blätter	<input type="checkbox"/> Gesonderte Angaben zu hinterlegten Mikroorganismen	
	<input type="checkbox"/> Sequenzprotokolle für Nukleotide und/oder Aminosäuren (Diskette)	
	<input type="checkbox"/> 8. X Sonstige (einzel aufführen): Postempfangsschein	

Abbildung Nr. 1 der Zeichnungen (falls vorhanden) soll mit der Zusammenfassung veröffentlicht werden.

Feld Nr. IX UNTERSCHRIFT DES ANMELDER ODER DES ANWALTS	
Der Name jeder unterzeichnenden Person ist neben der Unterschrift zu wiederholen, und es ist anzugeben, sofern sich dies nicht eindeutig aus dem Antrag ergibt, in welcher Eigenschaft die Person unterzeichnet.	
Renate Moldan (Leiterin der Patentverwaltung) X <i>Von Renate Moldan</i> IMMUNO AKTIENGESELLSCHAFT	<i>Daniel ALGE</i> ALGE Daniel (Patentanwalt)

Vom Anmeldeamt auszufüllen		
1. Datum des tatsächlichen Eingangs dieser internationalen Anmeldung:	27. FEBRUAR 1998 (27.02.98)	
3. Geändertes Eingangsdatum aufgrund nachträglich, jedoch fristgerecht eingegangener Unterlagen oder Zeichnungen zur Vervollständigung dieser internationalen Anmeldung:	<input checked="" type="checkbox"/> Zeichnungen einge-gangen: <input checked="" type="checkbox"/> nicht ein-gegangen:	
4. Datum des fristgerechten Eingangs der angeforderten Richtigstellungen nach Artikel 11(2) PCT:	<input type="checkbox"/> Übermittlung des Recherchenexemplars bis zur Zahlung der Recherchengebühr aufgeschoben	
5. Vom Anmelder benannte Internationale Recherchenbehörde:	ISA /	

Vom Internationalen Büro auszufüllen		
Datum des Eingangs des Aktenexemplars beim Internationalen Büro:	16 MARCH 1998 (16.03.98)	

PATENT COOPERATION TREATY

23

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

SONN, Helmut
Riemergasse 14
A-1010 Wien
AUTRICHE

Date of mailing (day/month/year) 26 July 1999 (26.07.99)
Applicant's or agent's file reference R 33814
International application No. PCT/AT98/00043

IMPORTANT NOTIFICATION

1. The following indications appeared on record concerning:

the applicant the inventor the agent the common representative

Name and Address IMMUNO AKTIENGESELLSCHAFT Industriestrasse 67 A-1221 Wien Austria	State of Nationality AT	State of Residence AT
	Telephone No.	
	Faximile No.	
	Teleprinter No.	

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

the person the name the address the nationality the residence

Name and Address BAXTER AKTIENGESELLSCHAFT Industriestrasse 67 A-1221 Wien Austria	State of Nationality AT	State of Residence AT
	Telephone No.	
	Faximile No.	
	Teleprinter No.	

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:	
<input checked="" type="checkbox"/> the receiving Office	<input type="checkbox"/> the designated Offices concerned
<input type="checkbox"/> the International Searching Authority	<input checked="" type="checkbox"/> the elected Offices concerned
<input type="checkbox"/> the International Preliminary Examining Authority	<input type="checkbox"/> other:

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer Jocelyne Rey-Millet Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	--

